

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462768

研究課題名(和文)敗血症に対する 遮断薬投与の臓器保護効果と機序の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the mechanisms how beta blockade therapy for sepsis can protect sepsis-induced organ injuries

研究代表者

鈴木 武志 (Takeshi, Suzuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80327600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、敗血症に対する 遮断薬投与の脾臓内Tリンパ球に対する効果について検討を行った。まずは生体外実験にて、カテコラミン刺激がマウスの脾臓Tリンパ球のアポトーシスを誘導するかどうかを検討し、濃度依存性にTリンパ球のアポトーシスを誘導することを示した。次に盲腸穿孔術によって作成したマウス敗血症モデルに対する 遮断薬投与の脾臓Tリンパ球への効果を検討したところ、敗血症にて激減する正常Tリンパ球の数を維持することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I evaluated the effect of beta blockade therapy on spleen T-lymphocytes in sepsis. After confirmation that catecholamine stimulation induced spleen T-lymphocytes apoptosis in a dose dependant manner, I evaluated the effect of beta blockade therapy on normal spleen T-lymphocytes, which were reduced according to the severity of sepsis. I used a cecum ligation and puncture (CLP) model as a septic model, which was a golden standard model for sepsis. Beta blockade therapy maintained the number of normal spleen T-lymphocytes, which were reduced dramatically in septic model. This result suggests that the preservation of immune function through maintenance of T-lymphocytes may be one of beneficial effects of beta blockde therapy in sepsis.

研究分野：麻酔学、集中治療医学

キーワード：敗血症 遮断薬 Tリンパ球 アポトーシス 免疫能

(1) 研究開始当初の背景

集中治療医学の目覚ましい進歩にも関わらず、敗血症患者の死亡率はいまだに高い。米国では敗血症患者の医療費が年 170 億ドルと報告され、医療経済面からも敗血症の治療は重要な課題の一つとなっている。

当研究室では、心血管系合併症を有する患者の周術期投与や熱傷患者に対する有効性が認められているβ遮断薬に着目し、β遮断薬が敗血症の過剰炎症反応や臓器傷害を軽減するとの仮説を立て検討してきた。これまでの研究では、敗血症モデル動物に対するβ遮断薬投与は、TNF-αの血中濃度を抑えて心機能障害を軽減、同時に腸管壁防御機能を温存することで腸内細菌移行現象(bacterial translocation)を抑制し、死亡率を改善することを見出した。その研究成果は敗血症に対するβ遮断薬投与の効能に言及した総説でも引用されている(Shock 2009;31:113)。しかし、敗血症に対するβ遮断薬の有効性の詳細な機序については、いまだに解明されていない点が多い。

敗血症では、免疫担当細胞の活性化に伴う過剰な炎症反応とそれに引き続き生じる免疫能低下が問題となるが、免疫能低下には、早期からのTリンパ球を中心にする免疫担当細胞のアポトーシスの関与が指摘されている。また、敗血症に伴う心機能傷害や腎機能傷害にもアポトーシスが関与していることが示されている。そして、敗血症における免疫担当細胞の活性化に伴う過剰な炎症反応や、引き続き起きる重要臓器細胞アポトーシスには、早期からの過剰な交感神経系の賦活化が関与していることが指摘されている。よって、敗血症に対するβ遮断薬の投与は、各臓器傷害の原因の一つであるとされているアポトーシスを抑制することによって、臓器傷害を軽減する可能性がある。

(2) 研究の目的

以上の背景を踏まえ、「β遮断薬が敗血症において、抗アポトーシス作用により重要臓器傷害を軽減する」との仮説を立てた。本研究は、以下の項目を主たる目的として実施した。

(1) カテコラミン刺激による培養心筋細胞及び脾臓Tリンパ球のアポトーシス誘導を検証し、β遮断薬による抑制効果を検討する。

(2) 腹膜炎惹起敗血症モデルを用いて、生体内における心筋細胞、腸管内ならびに脾臓リンパ球、腸管上皮細胞のア

ポトーシスに対するβ遮断薬の効果について検討を行う。

申請者らの知る限り、敗血症に対するβ遮断薬投与の重要臓器保護効果について、その機序を詳細に探求した研究は見当たらない。本研究において、敗血症に対するβ遮断薬投与の抗炎症作用ならびに抗アポトーシス効果による、免疫担当細胞及び心筋や腸管等の多数の重要臓器保護効果およびその機序が証明できれば、臨床応用への期待と具体的展開が一層高まる。さらに、β遮断薬は心血管系疾患あるいは頻脈性不整脈治療薬としてすでに臨床的に汎用されており、安全性の面からみても、敗血症患者への応用性は高い。

(3) 研究の方法

(1) 「実験1.カテコラミン刺激による脾臓リンパ球に対するアポトーシス誘導効果の検討」

セボフルラン麻酔下に健常マウスの脾臓を摘出し、Nylon wool column法によりTリンパ球のみを抽出する。採取したTリンパ球は、10%の血清を含んだ細胞培養液に懸濁し、CO₂インキュベーター内で培養する。採取して1時間以内に、Tリンパ球を血清が含まれない細胞培養液に移し、ノルアドレナリン(0.1、1.0、10、100 μM)ならびにアドレナリン(0.1、1.0、10、100 μM)による刺激を開始する。刺激開始24時間後にTリンパ球のアポトーシスをフローサイトメリーにて評価する。FSCおよびSCCによる評価にてリンパ球の評価に絞り、CD3抗原に対する抗体を用いて、Tリンパ球のみのアポトーシス評価を行う。早期アポトーシスの検出にはAnnexinVを用い、晚期アポトーシスの検出にはPopidium Iodineを用いる。

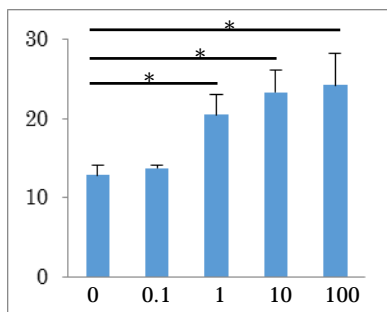
(2) 「実験2. In vivoにおける敗血症に対するβ遮断薬投与の血中サイトカインならびに脾臓Tリンパ球のアポトーシスに与える影響」

盲腸穿孔術によって敗血症モデルを作成後に、生理食塩水を投与する対照群とエスモロールの持続投与を行うエスモロール群に無作為に群分けする。24時間後に、全身麻酔下にて脾臓を摘出する。その際に採血を行い、白血球数、乳酸値、TNF-α、IL-1β、IL-6、CRPを測定する。摘出した脾臓からはNylon wool column法によりTリンパ球を分離して、実験1と同様に、蛍光標識の付いた抗CD3抗原抗体、AnnexinV、Popidium Iodineを用い、フローサイトメリーにて、Tリンパ球の早期ならびに晚期アポトーシスの評価を行う。

(4) 研究成果

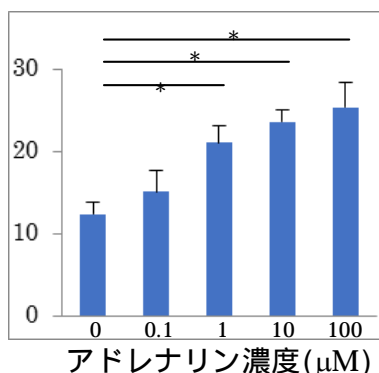
(1) まず生体外実験として、マウスの脾臓から Nylon wool column 法により摘出した T リンパ球を用いて、カテコラミンが T リンパ球のアポトーシスを誘導するかどうかを検討した。全身麻酔下にマウスから脾臓を取り出し、T リンパ球を抽出して血清の含まない細胞培養液に移した後に、ノルアドレナリン(0.1、1.0、10、100 μM) ならびにアドレナリン(0.1、1.0、10、100 μM) による刺激を行い、24 時間後にアポトーシスの評価を行った。どちらのカテコラミンも濃度依存性にアポトーシスを誘導した。

アポトーシス割合 (%)



ノルエピネフリン濃度(μM)
*: $p < 0.05$

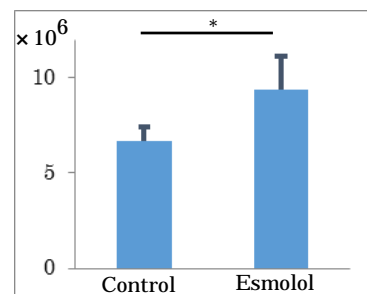
アポトーシス割合 (%)



*: $p < 0.05$

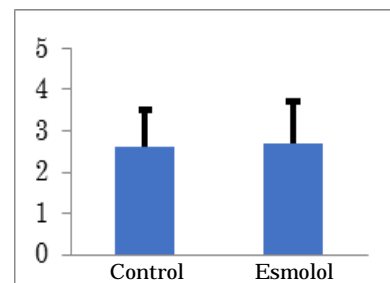
(2) 生体内実験では、盲腸穿孔術により作成したマウス敗血症モデルを用いた。まずは、敗血症の脾臓内正常 T リンパ球の数とアポトーシスに対する影響を検討する目的で、盲腸を結紮する場所を変えることによって 3 群の重症度が異なるモデルを作成し、1 脾臓あたりの正常 T リンパ球数を検討したところ、侵襲が重症になるにつれて、正常 T リンパ球数が減少した。アポトーシスの割合には差がなかった。次に、盲腸穿孔術を行ったあとに、生理食塩水の皮下注を行う control 群とエスモロールの皮下注を行う esmolol 群に群分けし、24 時間後に全身麻酔下で脾臓を摘出し、脾臓内正常 T リンパ球数とアポトーシスの割合を調べたところ、アポトーシスの割合には差がなかったものの、正常 T リンパ球の数は esmolol 群で有意に高いものとなった。この結果より、敗血症に対するエスモロール投与は、脾臓内正常 T リンパ球数を維持し、免疫能を高める可能性が示唆された。

正常 T リンパ球数



*: $p < 0.05$

アポトーシスの割合 (%)



なお、脾臓内 T リンパ球以外の臓器のアポトーシスに対する効果を検証するまでには至っていない。

(5) 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 鈴木武志、井上敬、五十嵐達、南嶋しづか、出野智史、佐藤悠、櫻井裕教、山田高成、小杉志都子、森崎浩：敗血症においてカテコラミンがリンパ球細胞死に与える影響。第42回日本集中治療医学会学術集会 2015 2 12 ホテル日航東京 (東京都・港区)

(2) Suzuki T, Inoue K, Igarashi T, Minamishima S, Katori N, Morisaki H. Beta-blocker therapy preserves the number of normal spleen T-lymphocytes which is reduced in proportion to the severity in septic model. (A1097) *Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists* Oct 11, 2014 New Orleans (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

(6) 研究組織

(ア) 研究代表者
鈴木 武志 (SUZUKI, Takeshi)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：80327600

(イ) 研究分担者
なし

(ウ) 連携研究者
なし

(エ) 研究協力者
なし